

携带 *bla*_{KPC-2} 型碳青霉烯酶基因泛耐药肺炎克雷伯菌医院内感染暴发的病原学分析

黄支密 糜家睿 盛以泉 邹玉秀 储秋菊 葛丽卫 杨海燕

【摘要】 目的 了解引起医院内感染暴发临床分离的泛耐药肺炎克雷伯菌(*Kpn*)KPC型碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 存在状况。方法 2008 年 11 月至 2009 年 7 月从住院患者中分离 19 株泛耐药 *Kpn*, 采用改良 Hodge 试验检测菌株产碳青霉烯酶情况, 采用 PCR 及序列分析的方法分析 *bla*_{KPC} 基因。结果 19 株泛耐药 *Kpn* 改良 Hodge 试验结果均阳性, *bla*_{KPC} 基因阳性率为 100.0%, 序列分析确认均为 *bla*_{KPC-2} 亚型, 其中 HZ001 号菌株(原始编号 HZ9871) *bla*_{KPC-2} 基因序列已登录 GenBank, 注册号为 GU086225。结论 临床分离的泛耐药 *Kpn* 均携带 *bla*_{KPC-2} 基因, 而产 KPC-2 型碳青霉烯酶是分离菌株对碳青霉烯类抗生素耐药的主要原因。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; 泛耐药; 碳青霉烯酶; 耐药基因

Study on pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring *bla*_{KPC-2} type carbapenemase gene from a hospital outbreak in Huzhou, Zhejiang HUANG Zhi-mi¹, MI Jia-rui², SHENG Yi-quan¹, ZOU Yuxiu¹, CHU Qiu-ju¹, GE Li-wei¹, YANG Hai-yan¹. 1 Microbiology Laboratory, the 98th Hospital of People's Liberation Army, Huzhou 313000, China; 2 Medical School, Jiangsu University
Corresponding author: HUANG Zhi-mi, Email: hzmccfhy@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the status of genotype of the KPC(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)-encoding genes in Pan-resistant *K. Pneumoniae*, isolated from the 98th Hospital of People's Liberation Army, Huzhou district, Zhejiang province, China. **Methods** 19 strains of Pan-resistant *K. pneumoniae* were isolated from the inpatients between November, 2008 and July, 2009. Phenotypic confirmatory test for suspected carbapenemases production were carried out by Modified Hodge test. Carbapenemase gene of *bla*_{KPC} was analyzed by PCR and verified by DNA sequencing. **Results** In 19 strains of *K. pneumoniae*, the positive rates of Modified Hodge test and gene of *bla*_{KPC} were both 100.0%. These genes all belonged to *bla*_{KPC-2} subtype confirmed by nucleotide sequence analysis. Among them, the *bla*_{KPC-2} gene sequence of the HZ001 strain (its original serial number was HZ9871) had been registered in GenBank (GenBank Accession Number: GU086225). **Conclusion** All of the Pan-resistant *K. pneumoniae* isolated from the inpatients harbored *bla*_{KPC-2} type carbapenemases gene and causing an outbreak in a hospital. Carbapenemases that producing type KPC-2 might be the major reason which causing the resistance to Carbapenems antibiotics.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; Pan-resistance; Carbapenemases; Drug resistance gene

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, *Kpn*)是医院感染的重要致病菌之一^[1-4], 有文献报道由该菌引起的医院感染可 > 5%, 且往往对多种抗菌药物耐药^[5]。近年来, 随着碳青霉烯类抗生素的大量使用, 出现了对其耐药的 *Kpn* 临床分离株^[6], 在美国甚至出现了碳青霉烯类抗生素耐药的 *Kpn* 流行^[7], 中国大陆地区也出现了因产 KPC-2 (*Klebsiella*

pneumoniae Carbapenemase-2)型碳青霉烯酶造成碳青霉烯类抗生素敏感性下降的 *Kpn* 局部流行^[8]。本研究采用分子生物学等技术分析临床标本中分离到的 19 株对亚胺培南和美罗培南耐药的 *Kpn* 中 KPC 型碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 存在状况。

材料与方法

1. 菌株来源及常规鉴定: 19 株试验菌株均分离自解放军第 98 医院 2008 年 11 月 19 日至 2009 年 7 月 4 日住院患者送检的各种标本, 分别为痰液 16 份, 烧伤创面分泌物、导尿、中段尿各 1 份。采用法国

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.019

作者单位: 313000 湖州, 解放军第 98 医院检验科(黄支密、盛以泉、邹玉秀、储秋菊、葛丽卫、杨海燕); 江苏大学临床医学院(糜家睿)

通信作者: 黄支密, Email: hzmccfhy@163.com

BioMérieux 公司 API 20 E 系统先进行常规菌种鉴定, 鉴定为“克雷伯菌属”。其中 1 株 API 编码为 5215773, 鉴定为 *Kpn* (鉴定值 $id=97.6\%$), 其余 18 株 API 编码均为 5205773, 鉴定结果可能为土生克雷伯菌 ($id=68.9\%$)、或 *Kpn* ($id=26.7\%$)、或产气肠杆菌 ($id=3.70\%$) 不定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、大肠埃希菌 ATCC 35218 (由浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所俞云松教授惠赠)、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

2. 菌株分子鉴定: 参照文献[9]进行。采用 PCR 法扩增 *gyrA* 基因, 引物为 P1: 5' -CGC GTA CTA TAC GCC ATG AAC GTA-3', P2: 5' -ACC GTT GAT CAC TTC GGT CAG G-3', 产物长 440 bp, 对 *gyrA* 基因 PCR 扩增产物进行测序, 所测序列采用 GenBank 中的 BLAST 程序进行同源性分析。

3. 药敏试验: 药敏纸片哌拉西林/舒巴坦为杭州天和微生物试剂有限公司产品, 氨曲南、头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦、美罗培南、头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸为英国 OXOID 公司产品, M-H 琼脂及 ATB 药敏试验板为法国 BioMérieux 公司产品。共测试 26 种抗菌药物的敏感性。其中 22 种系微量肉汤法, 采用 BioMérieux 公司产品 ATB 药敏试验板, 分别为阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林、替卡西林/克拉维酸、头孢噻吩、头孢西丁、头孢呋肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、亚胺培南、美罗培南、氨苄西林/舒巴坦、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、奈替米星、环丙沙星、复方新诺明、黏菌素。其余 4 种哌拉西林/舒巴坦、氨曲南、头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦采用纸片扩散法 (K-B 法)。根据 CLSI 2009 年版标准规定的临界值判定药敏结果^[10]。

4. ESBLs 表型确证试验: 参照文献[10]进行。

5. 改良 Hodge 试验检测菌株产碳青霉烯酶: 参照文献[10]进行。选用 10 μg 美罗培南纸片, 阳性对照菌株为携带 *bla_{KPC-2}* 碳青霉烯酶基因大肠埃希菌接合子 (由浙江大学医学院附属第二医院细菌室张嵘老师惠赠), 阴性对照菌株为大肠埃希菌 ATCC 35218。制备直径 90 mm、厚 4 mm 的 M-H 琼脂平板, 采用直接菌落悬液法用生理盐水制备 0.5 麦氏标准浊度的大肠埃希菌 ATCC 25922 (指示菌) 悬液, 使用自制的直径约 3 mm 的镍铬合金接种环, 对试验结果进行记录、拍照保存。

6. 细菌处理: 采用蛋白酶 K 消化法制备 DNA 扩增模板。挑纯培养菌落置入 0.5 ml 离心管内 (内预置 200 ng/ml 蛋白酶 K 溶液 200 μl), 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 改 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 加入 Chelex-100 40 μl , 离心 (15 000 r/min) 30 s。上清液即为基因检测的模板液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

7. *bla_{KPC}* 基因检测: 采用 PCR 法。根据 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中已发布的各型 *bla_{KPC}* 基因序列设计引物: P1: 5' -ATG TCA CTG TAT CGC CGT CTA-3', P2: 5' -TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA-3', 产物长 882 bp。耐药基因检测试剂盒、阳性对照及 DNA Marker 均由无锡市克隆遗传技术研究所提供。纯水为阴性对照。PCR 扩增体系均为: 每反应体系 P1、P2 引物各 0.5 $\mu\text{mmol/L}$, dNTPs 各 200 $\mu\text{mol/L}$, KCl 10 $\mu\text{mol/L}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 $\mu\text{mol/L}$, MgCl₂ 2 $\mu\text{mol/L}$, Tris-HCl (pH 值 9.0) 10 $\mu\text{mol/L}$, NP₄₀ 0.5%, BSA 0.02% (wt/vol), TaqDNA pol 1 U。总反应体积 20 μl (其中模板液 5 μl)。PCR 扩增产物 > 500 bp 热循环参数均为: 93 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 然后 93 $^{\circ}\text{C}$ 60 s \rightarrow 55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 循环 35 周期, 最后一个 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长至 5 min。PCR 扩增产物 < 500 bp 热循环参数均为: 93 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 然后 93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s \rightarrow 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 循环 35 周期, 最后一个 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长至 5 min。于 PE9600 基因扩增仪扩增。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外凝胶电泳成像仪下观察, 并记录结果。

8. 序列测定: 对所有扩增阳性基因 PCR 产物经纯化后用美国 ABI 公司 3730 型自动 DNA 序列分析仪进行序列测定 (正反向测序), *bla_{KPC}* 基因测序引物为 P1: 5' -ATG TCA CTG TAT CGC CGT CTA-3', P2: 5' -TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA-3', 所测序列采用 GenBank 中的 BLASTn 程序进行同源性分析, 并将基因核酸序列登录于 GenBank。

结 果

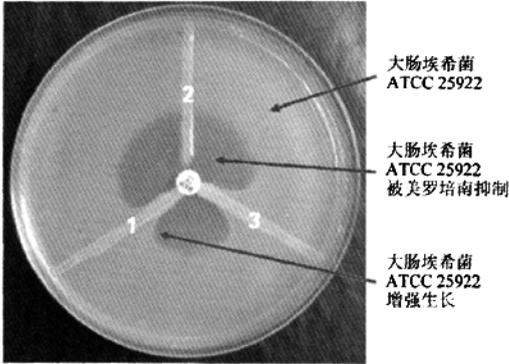
1. 菌株分子鉴定: 19 株菌经 *gyrA* 基因 PCR 扩增、测序、同源性分析, 确认均为 *Kpn*。其中 HZ001 号 (原始编号 HZ9871) 菌株 *gyrA* 基因序列已在 GenBank 登录 (注册号: GQ850532)。

2. 药敏试验: 所有菌株对黏菌素的 MIC \leq 2 mg/L, 参照不动杆菌属药敏试验规定的临界值标准判定为敏感^[10], 对其余 25 种抗菌药物均耐药, 提示多重耐药及交叉耐药情况相当严重, 系泛耐药株。

3. ESBLs 表型确证试验: 结果均为“不确定”,

即所产 β -内酰胺酶能水解第三代头孢菌素头孢他啶和头孢噻肟,且不被克拉维酸抑制,提示菌株可能同时产 ESBLs、质粒介导的 Amp C 酶、碳青霉烯酶。

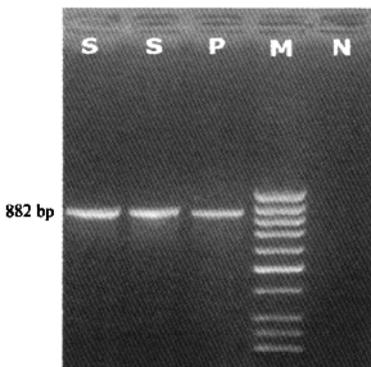
4. 改良 Hodge 试验:所有菌株结果均为阳性,提示菌株均产碳青霉烯酶(图 1)。



注:1:携带 bla_{KPC-2} 碳青霉烯酶基因大肠埃希菌接合子阳性结果; 2:大肠埃希菌 ATCC 35218 阴性结果; 3: *Kpn* 临床分离株阳性结果

图 1 改良 Hodge 试验检测 *Kpn* 临床分离株的产碳青霉烯酶阳性结果

5. 基因检测:所有菌株 bla_{KPC} 基因均阳性。图 2 为部分菌株 bla_{KPC} 基因 PCR 产物电泳图。



注:M:分子量标记,由上而下分别为 1000、900、800、700、600、500、400、300、250、200 bp; P:阳性对照; N:阴性对照; S:标本阳性

图 2 部分 *Kpn* 菌株 bla_{KPC} 基因 PCR 产物电泳图

6. 序列分析:本研究 19 株 bla_{KPC} 基因 PCR 阳性产物测得序列相同(882 bp),经 BLASTn 比对与 KPC-2 型碳青霉烯酶编码基因 bla_{KPC-2} 序列(GenBank 注册号:EU784136)完全相同。其中 HZ001 号菌株(原始编号 HZ9871) bla_{KPC-2} 基因序列已登录 GenBank(注册号:GU086225)。

万方数据

讨 论

KPC 型碳青霉烯酶是近几年发现的一种新型碳青霉烯酶,属于 Bush 分类的 2f 组, Ambler 分类的 A 类。Yigit 等^[11]于 2001 年首先报道在美国北卡罗来纳的 *Kpn* 中发现 KPC-1。2003 年在分离自马里兰医学中心的 *Kpn* 中发现 KPC-2^[12],此后又在不同的肠杆菌科细菌黏质沙雷菌及大肠埃希菌中相继检测到 KPC-2^[13],阴沟肠杆菌中发现 KPC-3(AM774409),致癌肠杆菌中发现 KPC-4(FJ473382),*Kpn* 中发现 KPC-6(EU555534.1)、KPC-7(EU729727.1)和 KPC-8(FJ234412.1),在以色列分离到的大肠埃希菌中发现 KPC-9(FJ624872.1),在波多黎各分离到的铜绿假单胞菌中发现 KPC-5(EU400222.2)^[14]。

从各地报道的资料看,导致 *Kpn* 对碳青霉烯类抗生素耐药或敏感性下降的原因有菌株产碳青霉烯酶如 KPC-2 型酶、IMP 型金属 β -内酰胺酶如 IMP-1 和 IMP-8 型酶、产 β -内酰胺酶如高产质粒介导的 Amp C 酶合并膜孔蛋白缺失等^[15],但以产 KPC 型碳青霉烯酶为主。

由于 *Kpn* 是医院感染的重要致病菌之一,其多重耐药及泛耐药菌株往往携带多种类质粒介导的耐药基因,如 ESBLs 基因、16S rRNA 甲基化酶基因^[11]、Amp C 酶基因等。最近,陆理英等^[4]报道 16S rRNA 甲基化酶基因 *armA* 和 *rmtB* 在产 KPC-2 泛耐药 *Kpn* 临床分离株中广泛分布,但 *armA*、*rmtB* 与 KPC-2 编码基因是否位于同一质粒还有待进一步研究证实。本组菌株对 4 种氨基糖苷类抗生素均耐药,很可能也是由于菌株携带 16S rRNA 甲基化酶基因和/或氨基糖苷类修饰酶基因并表达所致,相关研究正在进行中。改良 Hodge 试验用于怀疑产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌表型确证试验时,结果阳性提示菌株产碳青霉烯酶。由于质粒介导的 KPC 型碳青霉烯酶编码基因如 bla_{KPC-2} 基因具有在不同种属细菌之间转移和传播的特性^[12,13],极易造成医院感染的暴发,并且产 KPC 型碳青霉烯酶菌株往往为多重耐药株或泛耐药株,这给临床抗菌感染治疗造成极大困难。

杭州为我国大陆较早发现并分离出产 KPC-2 型碳青霉烯酶 *Kpn* 的地区,且有报道已造成局部流行^[6,8],同时在肠杆菌科其他种属细菌如阴沟肠杆菌中也发现 KPC 型酶^[16],江苏省也有关于分离出产 KPC-2 型碳青霉烯酶 *Kpn* 的报道^[17]。本组泛耐药株的药敏结果显示耐药状况极其严重,改良 Hodge 试验结果阳性提示菌株产碳青霉烯酶,基因序列分析

均携带KPC-2型碳青霉烯酶基因,至少表明产碳青霉烯酶是导致菌株对亚胺培南和美罗培南耐药主要原因(不能排除同时存在其他耐药机制)。本组菌株的分离时间为2008年11月19日至2009年7月4日,来自医院6个病区,以中心ICU为主(68.4%),主要引起颅脑外伤患者下呼吸道感染。分析表明由此引起的医院感染为一次较小规模的暴发。结合本研究资料进一步提示,携带产KPC型(如KPC-2)碳青霉烯酶基因的泛耐药Kpn未来很有可能会在我国大陆地区,特别是东南沿海地区扩散流行,对此应给予足够重视。

参 考 文 献

[1] Huang ZM, Mi ZH, Chu QJ, et al. Emergence of 16S rRNA methylase gene *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates from the inpatients in Zhejiang province, China. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(9):909-914. (in Chinese)
黄支密,糜祖煌,储秋菊,等.肺炎克雷伯菌临床分离株中出现16S rRNA甲基化酶基因*rmtB*. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(9):909-914.

[2] Guo XL, Wang DC, Zhang YM, et al. Isolation, identification and 16S rDNA phylogenetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* from diarrhea specimens. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(12):1225-1229. (in Chinese)
郭晓琳,王多春,张燕敏,等.腹泻标本中肺炎克雷伯菌的分离鉴定和16S rDNA系统进化分析. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(12):1225-1229.

[3] Hu QF, Lv HX, Mi ZH, et al. Drug resistance genes of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Chin J Nosocomiol*, 2009, 19(13):1634-1637. (in Chinese)
胡庆丰,吕火祥,糜祖煌,等.泛耐药肺炎克雷伯菌的耐药基因研究. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(13):1634-1637.

[4] Lu LY, Zhang WL, Yang Q, et al. The distribution of 16S rRNA methylase genes in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains. *Chin J Clin Infect Dis*, 2009, 2(2):71-73. (in Chinese)
陆理英,张伟丽,杨青,等.16S rRNA甲基化酶在产KPC酶肺炎克雷伯菌中的分布. *中华临床感染病杂志*, 2009, 2(2):71-73.

[5] Wang YH, Deng M, Zeng J. Drug-resistance mechanism of *Klebsiella pneumoniae*: a research progress. *Chin J Nosocomiol*, 2007, 17(4):478-480. (in Chinese)
王玉红,邓敏,曾吉.肺炎克雷伯菌耐药机制研究进展. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(4):478-480.

[6] Zhang XG, Du XX, Zhang R, et al. Plasmid-mediated carbapenemase KPC-2 in a strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Chin J Lab Med*, 2006, 29(9):824-826. (in Chinese)
张幸国,杜小幸,张嵘,等.发现一株产KPC-2型碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(9):824-826.

[7] Bratu S, Landman D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med*, 2005, 165(12):

1430-1435.

[8] Feng YJ, Shen P, Du XX, et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2. *Zhejiang Med J*, 2008, 30(9):923-925, 930. (in Chinese)
冯雅君,沈萍,杜小幸,等.产碳青霉烯酶KPC-2肺炎克雷伯菌局部流行. *浙江医学*, 2008, 30(9):923-925, 930.

[9] Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(Pt 3):915-924.

[10] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement, 2009, 29(3):38-42, 46-47, 120-121, 136-139.

[11] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4):1151-1161.

[12] Smith ME, Hanson ND, Herrera VL, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(3):711-714.

[13] Zhang R, Cai JC, Zhou HW, et al. Identification of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Enterobacteriaceae*. *Chin J Lab Med*, 2008, 31(10):1134-1141. (in Chinese)
张嵘,蔡加昌,周宏伟,等.肠杆菌科细菌中质粒介导的KPC-2型碳青霉烯酶的检测. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(10):1134-1141.

[14] Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(2):557-562.

[15] Zhang R, Cai JC, Zhou HW, et al. Reduced carbapenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates is due to combination of β -lactamases and the loss of OmpK36 porin. *Chin J Microbiol Immunol*, 2008, 28(1):44-49. (in Chinese)
张嵘,蔡加昌,周宏伟,等. β -内酰胺酶合并OmpK36膜孔蛋白缺失引起肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素敏感性的降低. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 28(1):44-49.

[16] Cai JC, Zhou HW, Chen GX, et al. Detection of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in a strain of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*. *Natl Med J China*, 2008, 88(2):135-138. (in Chinese)
蔡加昌,周宏伟,陈功祥,等.一株耐碳青霉烯类的阴沟肠杆菌的KPC酶检测. *中华医学杂志*, 2008, 88(2):135-138.

[17] Kuai SG, Shao HF, Wang WP, et al. A study of molecular and epidemical mechanism of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Chin J Clin Lab Sci*, 2008, 26(5):358-361. (in Chinese)
蒯守刚,邵海枫,王卫萍,等.肺炎克雷伯菌介导碳青霉烯类耐药的基因型检测. *临床检验杂志*, 2008, 26(5):358-361.

(收稿日期:2009-11-01)

(本文编辑:张林东)